

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Section de biologie
Département de biologie végétale

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur J. Miège

CONTRIBUTION A LA CARACTÉRISATION ET A LA BIOLOGIE
DES LECTINES DANS LA GRAINE DE PHASEOLUS VULGARIS L.
VAR. CONTENDER

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences biologiques

par

JEAN-FRANÇOIS MANEN

de Reignier
France

Thèse n° 1866

GENÈVE

Société botanique de Genève
1978

Texte condensé de la thèse n° 1866 approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale à Berne.

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Section de biologie
Département de biologie végétale

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur J. Miège

CONTRIBUTION A LA CARACTÉRISATION ET A LA BIOLOGIE
DES LECTINES DANS LA GRAINE DE PHASEOLUS VULGARIS L.
VAR. CONTENDER

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention sciences biologiques

par

JEAN-FRANCOIS MANEN

de Reigniet
France

Thèse n° 1866

GENÈVE

Société botanique de Genève
1978

Texte condensé de la thèse n° 1866 approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale à Berne.



La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs J. Miège, professeur ordinaire et directeur de thèse, H. Greppin, professeur ordinaire (Département de biologie végétale), Madame M.-N. Miège, chargée de cours (Département de biologie végétale) et Monsieur A. Pusztai, docteur ès sciences (Rowett Research Institute, Aberdeen), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 17 mai 1978
Thèse n° 1866

Le Doyen:
Bernard Levrat

Texte condensé de la thèse n° 1866 approuvée par la Faculté des sciences. Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale à Berne.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

C'est grâce à la curiosité scientifique de Monsieur et Madame Miège que ce travail a été entrepris. Ce sont eux qui m'ont fait découvrir les "lectines". Ils ont su me montrer que la fonction lectinique est susceptible de prendre de l'importance en biologie cellulaire. Je les en remercie.

La critique de mon travail par Monsieur Pusztai a été très bénéfique. Il a été pour moi un exemple de rigueur et de finesse dans l'interprétation des résultats expérimentaux. Je le remercie de ses nombreuses suggestions pour approfondir cette ébauche.

Je remercie également Monsieur Greppin pour avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps qu'il a distrait de ses activités pour me prodiguer conseils et remarques.

Ma reconnaissance va également à Monsieur Maréchal qui m'a fourni les nombreuses graines que j'ai utilisées dans ce travail, ainsi qu'à tous ceux qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre.

Contribution à la caractérisation et à la biologie des lectines dans la graine de *Phaseolus vulgaris* L., var. contender

JEAN-FRANÇOIS MANEN

Résumé

MANEN, J.-F. (1978). Contribution à la caractérisation et à la biologie des lectines dans la graine de *Phaseolus vulgaris* L., var. contender. *Saussurea* 9: 23-44.

Après la purification et la caractérisation qualitative et quantitative des lectines dans les albumines et dans les globulines des graines de *Phaseolus vulgaris*, les interactions possibles entre celles-ci et d'autres substances de la graine ont été recherchées. En fait, des interactions lectines-lectines ont été démontrées. L'évolution, pendant la maturation et la germination des lectines purifiées des cotylédons a été observée. Des lectines présentes dans les téguments, libérées à l'extérieur pendant la germination sont très différentes de celles de l'embryon. A la lumière des résultats obtenus, une fonction spéciale des lectines (elles-mêmes vraisemblablement réserves) en relation avec les processus de stockage dans les corps protéiques a été suggérée.

Abstract

MANEN, J.-F. (1978). Contribution to the characterization and biology of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* L., var. contender. *Saussurea* 9: 22-44. In French.

After purification, qualitative and quantitative characterization of albuminic and globulinic lectins from *Phaseolus vulgaris* seeds, the possible interactions between them and others seeds' components are searched. In fact, lectins-lectins interactions are demonstrated. The development, during maturation and germination, of purified lectins from cotyledons is studied. Lectins from teguments, released during germination, are very different from embryo lectins. Considering the results, a special function of the lectins (themselves certainly reserves) in relation to the stockage processes in protein-bodies is suggested.

Introduction

Il y a plus de cent ans, on découvrait que des extraits de certains tissus de plantes (graines surtout, mais aussi quelquefois tiges et racines) avaient des propriétés particulières sur les cellules animales. La première propriété découverte fut celle d'agglutiner les globules rouges. Les substances actives de ces extraits furent appelées phytohémagglutinines (PHA).

Certaines de ces PHA ont été isolées et purifiées: ce sont de grosses protéines (ou plutôt des glycoprotéines) formées de plusieurs sous-unités. Chacune de ces sous-unités possède un site de liaison spécifique aux sucres. Il s'agit de liaisons faibles (interactions électrostatiques) de type de celles formées entre un anticorps et un antigène.

De plus, cette liaison est spécifique: telle PHA fixe tel sucre, telle autre, isolée d'une autre plante, fixe un autre sucre. De cette propriété, découle l'activité érythroagglutinante des PHA: la surface des érythrocytes est composée de sucres variés. Une PHA ayant plusieurs sites de liaison à l'un de ces sucres est donc capable de les agglutiner.

Cette spécificité des phytohémagglutinines a conduit à leur dénomination actuelle: les lectines (latin: *legere* = choisir). Ceci pour expliquer leur propriété fondamentale (liaison spécifique aux sucres) et non les effets secondaires découlant de cette propriété (agglutination des érythrocytes). Ceci d'autant plus que les propriétés des lectines sur les cellules par interaction avec leur surface sont innombrables (LIS & SHARON, 1973). La fixation d'une lectine sur la surface d'une cellule, entraîne toutes sortes d'événements qui peuvent atteindre le noyau. Inversement, tout événement survenant dans le noyau se répercute jusque sur la surface cellulaire. Cette répercussion peut être mise en évidence par les lectines (FOX & al., 1971).

La fonction précise des lectines trouvées dans les graines est encore inconnue. Il y a, à l'heure actuelle, de bonnes raisons de penser qu'elles sont situées dans les corps protéiques, peut-être en partie associées à leur membrane (PUSZTAI & al., 1977; TULLY & BEEVERS, 1976; CLARKE & al., 1975). Notre laboratoire, travaillant sur les protéines de graines, et en particulier sur les graines de légumineuses, très riches en lectines, nous nous sommes attaqués au problème de leur fonction en l'étudiant sur la graine de *Phaseolus vulgaris*.

Ce sont avec la ConA, les lectines de *Phaseolus vulgaris* qui ont été les plus étudiées. Pourtant, pour cette dernière espèce, jusqu'à de récents travaux, les résultats étaient "souvent contradictoires et dans une certaine mesure confus" (LIS & SHARON, 1973). La seule chose qui était acquise, était que les lectines de *Phaseolus vulgaris* étaient formées de sous-unités de PM d'environ 30 000 et que, à l'état natif le PM était de 120 000. Il s'agissait donc de tétramères. Cependant, une ligne directrice s'est dessinée lorsqu'on s'est aperçu que l'activité érythroagglutinante pouvait être dissociée de l'activité leucoagglutinante et mitogène. ALLEN & al. (1969) séparent une lectine uniquement leucoagglutinante (L-PHA) et une autre, électrophorétiquement hétérogène qui est à la fois leuco- et érythroagglutinante (E-PHA). ALLAN & CRUMPTON (1971), à partir d'une lectine agglutinante et mitogène mettent en évidence en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate), deux sous-unités de PM 29 000 et 33 000. Seule la sous-unité de PM 29 000 (après réassociation par dialyse du SDS) présente une activité leucoagglutinante et mitogène. OH & CONARD (1972) arrivent aux mêmes résultats, si ce n'est que les monomères ont des PM plus proches l'un de l'autre (35 000 et 36 000). WEBER & al. (1972) montrent que L-PHA est composée de sous-unités identiques alors que E-PHA est composée de deux sous-unités différentes non par leur PM (ALLAN & CRUMPTON, 1971; OH & CONARD, 1972) qui est identique (36 000) mais par leur charge électrique. L'une de ces deux sous-unités est identique à celle de L-PHA. Comme L-PHA et E-PHA ont en commun une activité leucoagglutinante, il est concevable que c'est la sous-unité commune aux deux

lectines qui la porte. YACHNIN & SVENSON (1972) analysent les L-PHA et E-PHA de ALLEN & al. (1969). La L-PHA est homogène, leucoagglutinante et non érythroagglutinante. La E-PHA est hétérogène en électrophorèse (au moins 3 bandes). Plus les fractions sont catodiques, plus l'activité leucoagglutinante diminue et plus l'activité érythroagglutinante augmente. Enfin MILLER & al. (1973) et MILLER & HSU (1975) arrivent à la conclusion que les lectines de *Phaseolus vulgaris* existent sous les cinq formes tétramériques (AAAA, AAAB, AAB, AB, B) qu'il est possible de former à partir de deux sous-unités différentes (A et B), l'une étant la sous-unité leucoagglutinante et mitogène, l'autre la sous-unité érythroagglutinante. Les tétramères ont une mobilité catodique proportionnelle au nombre de sous-unités leucoagglutinantes qu'ils comportent et inversement proportionnelle au nombre de sous-unités érythroagglutinantes, les deux sous-unités diffèrent uniquement par leur point isoélectrique et non par leur PM qui est de 34 000. Elles sont assez semblables: sur les 24 acides aminés de la partie NH₂-terminale, les différences sont situées sur les 7 premiers acides aminés. Les différences d'activité biologique semblent être le résultat d'une différence minime de la structure primaire.

Tous ces travaux portent sur une variété de *Phaseolus vulgaris*: "Red Kidney Bean". Et même, beaucoup partent d'un lyophilisat commercialisé (Difco) de lectines semi-purifiées provenant de "Red Kidney Bean". Ceci explique les résultats assez homogènes obtenus par différentes équipes. Cependant, les résultats obtenus sur d'autres variétés de *Phaseolus vulgaris* sont totalement différents. SELA & al. (1973), sur "Wax Bean" observent deux tétramères formés de 4 sous-unités identiques de PM 30 000. Les deux tétramères formés sont à la fois mitogènes et agglutinants. TAKAHASHI & al. (1974) sur un "Wax Bean" obtiennent un seul tétramère formé de deux sous-unités différentes (PM 20 000 et 25 000). Sur "Navy Bean", ANDREWS & JAYN-WILLIAMS (1974) observent un tétramère agglutinant et mitogène formé de monomères absolument identiques (PM 32 000). Ainsi il semble que l'on a de grandes variations sur la structure des lectines de *Phaseolus vulgaris* suivant la variété considérée (MANEN, 1978).

L'étude de la spécificité des lectines est basée sur l'inhibition hapténique de l'agglutination par des monosaccharides. Cependant pour *Phaseolus vulgaris*, aucun monosaccharide n'est inhibiteur, sauf à des concentrations extrêmement fortes (galactose, N-acétyl-galactosamine). KORNFELD & KORNFELD (1970) ont isolé des membranes d'érythrocytes un glycopéptide du récepteur des lectines de *Phaseolus vulgaris*. Ce glycopéptide, sur une base molaire, est 60 000 fois plus inhibiteur pour la lectine que le N-acétyl-galactosamine (LESENEY & al., 1972). La thyroglobuline de porc est une glycoprotéine qui peut être précipitée par les lectines de *Phaseolus vulgaris*. Un glycopéptide obtenu à partir de thyroglobuline a une structure et des propriétés voisines de celles du récepteur érythrocytaire (TOYOSHIMA & al., 1972). Les lectines de *Phaseolus vulgaris* ont donc un site de liaison qui "reconnaît", non pas un monosaccharide, mais une structure oligosaccharidique plus complexe, dans une conformation très précise.

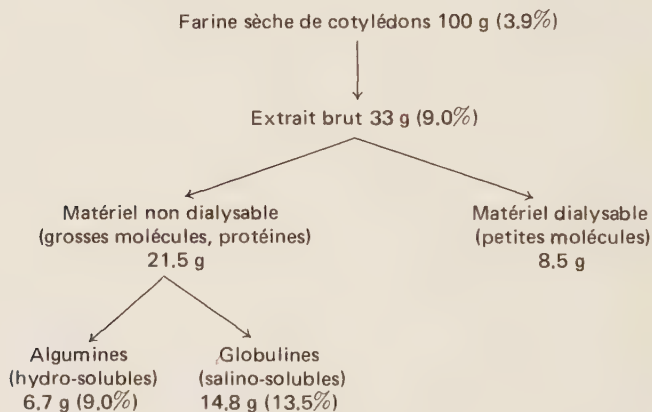
Matériel et méthodes

Graines

Phaseolus vulgaris L. (variété *contender*, Besson-Decroix 5838), obtenu par M. Gagnebin à la Station de botanique expérimentale de l'Université de Genève. Cette variété se situe parmi celles qui donnent les plus grosses graines de l'espèce *vulgaris* puisqu'elles mesurent environ 18-20 mm et pèsent environ 500 mg.

Préparation des extraits bruts, albumines et globulines

La méthode est celle décrite dans MANEN & MIÈGE (1977). Les proportions relatives des différents extraits obtenus à partir de 100 g de farine sèche de cotylédons sont présentées dans le graphique ci-après (le pourcentage entre parenthèse représente le taux d'azote correspondant).



Pour les axes, le pourcentage d'extrait-brut est plus important, mais cette augmentation ne correspond qu'au matériel dialysable et non aux albumines et globulines qui restent de même proportion. Les albumines et les globulines représentent environ 75% de l'azote protéique de la graine. Elles correspondent en majeure partie aux protéines de réserve de la graine. Vraisemblablement une partie importante de ces protéines constitue les corps protéiques de la graine. C'est dans les globulines que l'on trouve la glycoprotéine II (viciline) constituant majeur des protéines de réserve (DERBYSHIRE & al., 1976; PUSZTAI & WATT, 1970). Albumines aussi bien que globulines contiennent des activités enzymatiques qui peuvent être intégrées dans les corps protéiques ou liées aux systèmes membranaires ou

cytoplasmiques. La signification fonctionnelle des albumines et des globulines (séparées expérimentalement sur le seul critère de leur solubilité) est loin d'être résolue.

Purification des lectines

Chromatographie d'affinité sur Sépharose-thyroglobuline (MANEN & MIÈGE, 1977).

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Celles à pH 4.5 sont faites suivant la méthode de REISFELD & al. (1962), gel de polyacrylamide à 7.5%.

Celles à pH 8.3 se font suivant la méthode de MAURER (1971), gel de polyacrylamide à 7.5%.

Les électrophorèses dénaturantes se font suivant la méthode de LAEMMLI (1970) modifiée. Les échantillons sont dissous dans une solution de SDS (2%), 2-mercaptoéthanol (5%), urée (6M) et Tris-HCL (0.0625M), pH 6.8, puis dénaturés à 100°C pendant 5 min. Gel à 10% d'acrylamide et 0.05% de NN-Bisméthylèneacrylamide, en présence de SDS 0.1%; tampon de migration SDS 0.1%, Tris-glycine 0.005M, pH 8.3.

Détermination de la teneur en protéines

Méthode de LOWRY & al. (1951), en utilisant de l'albumine de sérum bovin (Fluka) comme étalon.

Test d'érythroagglutination

Méthode semi-quantitative de SALK (1944) en utilisant le matériel de microdilution de Cooke Engineering Company, Alexandria, Wisconsin.

Résultats

Purification et caractérisation des lectines

Nous allons considérer dans un premier temps les lectines extraites des globulines cotylédonaire. Les globulines et leurs lectines purifiées sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant (pH 8.3 et 4.5) et dénaturant (SDS). La figure 1 représente les électrophorégrammes obtenus.

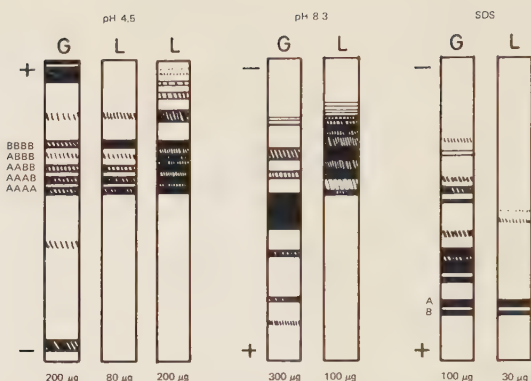


Fig. 1. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des globulines de cotylédons (G) et de leur lectines purifiées (L).

A pH 8.3, les lectines purifiées apparaissent très hétérogènes puisqu'on peut compter plus de 15 bandes. Cependant, à pH 4.5 il apparaît seulement 5 bandes majeures, que l'on retrouve nettement dans le diagramme des globulines à pH 4.5. En présence de SDS, ces 5 bandes majeures se réduisent à deux bandes majeures que l'on retrouve aussi sur le diagramme des globulines en présence de SDS. Les bandes mineures représentent vraisemblablement des polymères non dénaturés.

Les deux bandes A et B, obtenues en présence de SDS représentent les deux sous-unités constitutives des 5 tétramères apparaissant en électrophorèse non dénaturante à pH 4.5: AAAA, AAAB, AABB, AB BB et BBBB (MILLER & al., 1973; LEAVITT & al., 1975).

Quelle est la raison de la forte hétérogénéité du diagramme des lectines à pH 8.3? L'électrophorégramme à pH 4.5 d'un échantillon concentré de lectines (fig. 1) se

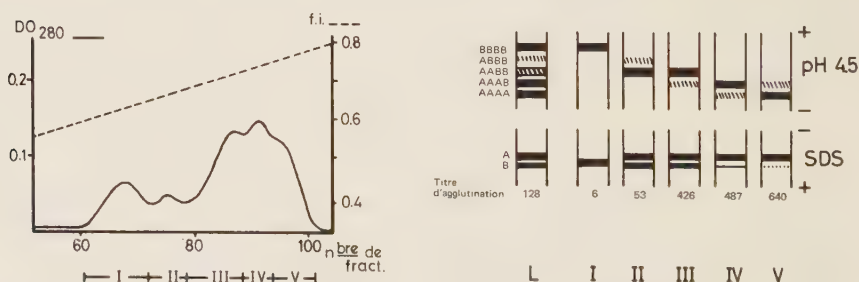


Fig. 2. — Séparation des 5 tétramères sur SP-Séphadex. Colonne de 50 ml (30 × 1.5 cm). Échantillon de 25 mg dans tampon acétate 0.05M, NaCl 0.3M, pH 3.6. Fraction de 10 ml. Tampon d'éluion acétate 0.05M, pH 3.6, en gradient linéaire de force ionique, NaCl 0.3M → 0.8M. Les fractions I à V sont dialysées, lyophilisées, et analysées en électrophorèse. Leur activité érythroagglutinante spécifique pour 1 mg Lowry est mesurée.

caractérise par la décroissance en progression géométrique de la mobilité des bandes mineures. Ceci suggère des structures moléculaires dont la taille varie selon une suite arithmétique (voir par exemple le diagramme obtenu par ELSON & JOVIN, 1969, avec des désoxyribonucléotides d(AT) $_n$, $3 < n < 30$). Ainsi, ces différentes bandes mineures correspondraient à des agrégats de deux, trois, quatre... tétramères. Une certaine tendance à l'agrégation des lectines de *Phaseolus vulgaris* a été signalée par DAHLGREN & al. (1970), et par PUSZTAI & WATT (1974). Ainsi à pH 8.3 la superposition des 5 tétramères et des multiples agrégats entre les tétramères pourrait conduire à un diagramme électrophorétique complexe.

Une caractérisation plus précise des lectines peut être tentée en essayant de séparer sur résine échangeur d'ions les différents tétramères (fig. 2). On utilise une colonne de SP-Séphadex G50, échangeur de cations. L'élution par un faible gradient de force ionique, permet d'obtenir un profil hétérogène. Les 5 fractions notées sur la figure 2 sont analysées en électrophorèse non dénaturante à pH 4.5, et en électrophorèse en présence de SDS. De plus, l'activité agglutinante a été mesurée pour chaque fraction. La comparaison entre le diagramme à pH 4.5 des lectines totales et celui des différentes fractions obtenues par le SP-Séphadex, montre qu'une séparation satisfaisante des 5 tétramères a été obtenue. Les résultats de la mesure de l'activité agglutinante permettent de conclure avec MILLER & al. (1973) et LEAVITT & al. (1975) que les tétramères les plus cathodiques ont une activité érythroagglutinante croissante. D'après ces auteurs on peut conclure que les tétramères leucoagglutinants sont les plus anodiques.

Cependant, nous n'avons malheureusement pas testé l'activité leucoagglutinante de nos lectines, et nous admettons les résultats de MILLER & al. (1973), (voir, néanmoins, les travaux de PUSZTAI & WATT, 1974, qui ne peuvent dissocier l'activité érythroagglutinante de l'activité leucoagglutinante). Les résultats de l'électrophorèse en présence de SDS des différentes fractions obtenues, permettent de déduire que la sous-unité B, plus mobile (donc de plus faible poids moléculaire) est la sous-unité leucoagglutinante et mitogène. La sous-unité A, moins mobile (donc de plus haut poids moléculaire) est la sous-unité érythroagglutinante (MANEN & MIÈGE, 1977).



Fig. 3. — Electrophorégramme à pH 4.5 des lectines purifiées à partir de l'extrait brut (EB), des albumines (A), des globulines (G) des cotylédons et des axes. 80 μ g d'échantillon par tube.

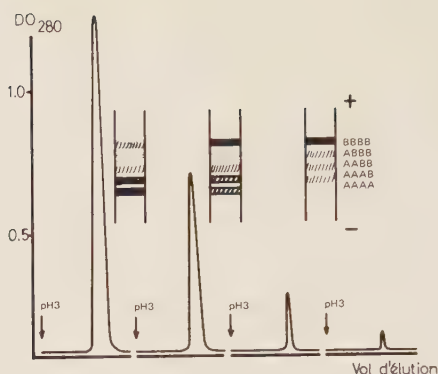


Fig. 4. — Captures successives des lectines à partir de 500 mg de globulines sur Sépharose-thyroglobuline. Les trois premières captures sont analysées en électrophorèse à pH 4.5.

Les électrophorégrammes des lectines des différentes familles protéiques des axes et des cotylédons sont représentés sur la figure 3. Dans les cotylédons, les albumines aussi bien que les globulines contiennent des lectines. Mais la répartition des 5 tétramères dans ces deux familles protéiques n'est pas la même. Les albumines contiennent surtout des tétramères AAAB et AABB, alors que les globulines contiennent surtout les tétramères AAAA, AAAB et BBBB. Dans les axes, il y a peu de lectines dans les albumines. Celles de l'extrait brut et des globulines présentent la même répartition des tétramères que dans les cotylédons, mise à part une certaine prépondérance des tétramères 5 par rapport aux tétramères 1 et 2.

Après plusieurs passages d'un même extrait (albumines ou globulines) sur la colonne Séphadex-thyroglobuline, on arrive à débarasser totalement ces extraits de leurs lectines. On peut ainsi avoir le pourcentage pondéral des lectines par rapport aux albumines (10.0%) et aux globulines (13.2%). La figure 4 montre les captures successives des lectines des globulines cotylédonaires, ainsi que le diagramme électrophorétique à pH 4.5, des différentes captures. On remarque que les tétramères érythroagglutinants (AAAA) sont captés plus rapidement que les tétramères leucoagglutinants (BBBB), autrement dit, ces derniers ont moins d'affinité pour la thyroglobuline que les tétramères érythroagglutinants. Cette propriété avait déjà été signalée par FELSTED & al. (1975).

Recherche d'interactions moléculaires impliquant les lectines

Si le site de liaison des lectines est impliqué dans des interactions avec des molécules ou des structures contenant des sucres, il faut rechercher *in vitro* la capture de telles substances par les lectines. Cependant la démonstration de telles interactions ne signifie pas qu'elles existent *in vivo*.

Interaction avec des substances dialysables de l'extrait brut

Si on compare le diagramme électrophorétique à pH 4.5 des lectines purifiées de l'extrait brut et le diagramme de l'extrait brut total (fig. 5), on remarque une différence dans l'aspect des bandes lectiniques. Dans le cas des lectines purifiées, les 5 bandes représentant les 5 tétramères sont équidistantes. En revanche dans la région "lectine" du diagramme de l'extrait brut total, on retrouve bien 5 bandes, mais non équidistantes. Après dialyse, les bandes lectiniques des albumines et des globulines deviennent équidistantes. Ainsi, cette différence de mobilité électrophorétique des tétramères selon qu'ils sont purifiés ou intégrés dans l'extrait brut, s'estompe au cours de la dialyse. Les deux processus de purification et de dialyse ont donc le même effet sur la mobilité électrophorétique des lectines.

La présence d'une grande variété de substances dialysables dans l'extrait brut, notamment saccharidiques, pourrait conduire à l'établissement de liaisons lectines-sucres, ayant pour effet de modifier la charge de lectines, leur poids moléculaire, ou ces deux caractères, qui conditionnent la mobilité électrophorétique. Les processus de purification par capture ou par dialyse, supprimeraient ces liens. On sait, en effet, que la liaison lectine-sucré, de type non covalente, peut être brisée par la dialyse, si la substance liée à la lectine est dialysable.

Pour vérifier que des substances dialysables de l'extrait brut peuvent être captées par des lectines, l'activité agglutinante d'un extrait brut a été comparée avant et après dialyse. En effet, si des lectines ont leur site de liaison occupés, leur activité agglutinante devrait être moindre avant la dialyse. En fait aucune augmentation de l'activité agglutinante n'a été observée. 200 mg d'extrait brut sont dialysés contre l'eau distillée. Le dialysat obtenu, concentré par lyophilisation (environ 60 mg), repris dans 1 ml de tampon salin à pH 7 n'a aucun effet inhibiteur de l'activité agglutinante des lectines de l'extrait brut.

Il semble donc que la non-équidistance électrophorétique des tétramères lectiniques de l'extrait brut entier soit due à autre chose qu'à la formation de complexes spécifiques lectines-substances du dialysat. L'effet de la dialyse sur l'équidis-

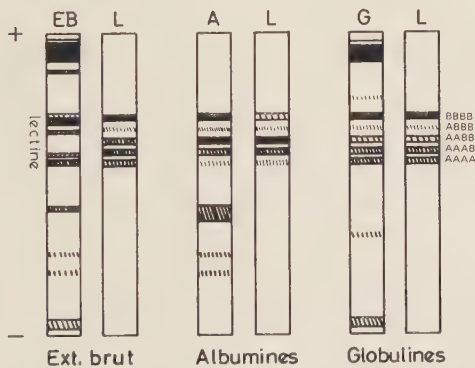


Fig. 5. -- Diagramme électrophorétique à pH 4.5 de l'extrait brut (EB), des albumines (A), des globulines (G) et de leurs lectines respectives purifiées (L).

tance des tétramères, pourrait être le départ de substances dialysables, interagissant de façon non spécifique avec les lectines (ions, petites molécules organiques).

Interaction avec des substances globuliniques

Les lectines globuliniques, une fois purifiées, deviennent solubles dans l'eau (la dialyse contre l'eau distillée ne fait apparaître aucun précipité). Le caractère de solubilité qui séparait albumines et globulines, ne permet plus de séparer les lectines albuminiques et globuliniques. Le fait d'être intégrées dans les globulines rend les lectines globuliniques insolubles. Il existe donc des interactions entre les lectines et les autres protéines globuliniques.

Pour préciser les interactions en cause, nous avons mis en contact des globulines cotylédonaires dépourvues de leurs lectines, et des lectines globuliniques purifiées. Pour cela, des globulines sont débarrassées de leur lectines par plusieurs captures sur Sépharose-thyroglobuline, dialysées, lyophilisées, resolubilisées dans NaCl 4%, enfin mises en présence d'une solution de lectines purifiées d'origine globulinique. Ce mélange est soumis à une dialyse contre l'eau distillée, le surnageant est séparé du précipité globulinique. Ce dernier est lavé et redissous dans un même volume de NaCl 4% que celui du surnageant. En faisant des tests d'agglutination sur le surnageant et sur le précipité globulinique, on saura si les lectines purifiées ajoutées (solubles dans l'eau), sont restées solubles ou ont été captées par des globulines dans le précipité.

Concentration (mg/ml)	Titre d'agglutination				
	Lectines (5 ml)	Globulines—lectines (5 ml)	Mise en présence (10 ml)	Après dialyse	
				Précipité (10 ml)	Surnageant (10 ml)
0.5	256				
0.25		0	128	32	128
0.5		0	128	32	128
1		0	128	64	64
2		0	128	64	64
4		0	128	128	32
8		0	128	128	32

Tabl. 1. — Expérience de capture des lectines globuliniques par des globulines débarrassées de leurs lectines. Toute l'expérience est faite en présence de NaCl 4%, tampon phosphate 0.001M, pH 7.

Le tableau 1 résume cette expérience et donne les résultats obtenus. Une partie au moins des lectines a été captée par les globulines. Plus la concentration de globulines est élevée, plus l'activité agglutinante se retrouve dans le précipité globulinique. De plus, ce sont surtout les tétramères 4 et 5 qui ont été captés par les globulines débarrassées de leur lectines (fig. 6).

Pour confirmer, ou non, une interaction entre lectines et globulines, deux expériences ont été faites:

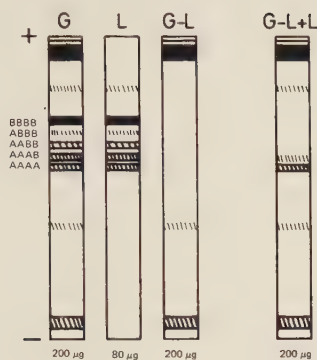


Fig. 6. — Diagramme électrophorétique des globulines (G), de leurs lectines (L), des globulines débarrassées de leurs lectines (G-L) et de ces dernières après capture des lectines (G-L+L), qui correspondent au précipité après dialyse à la concentration de 8 mg/ml de G-L (tabl. 1).

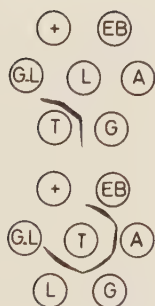


Fig. 7. — Double diffusion sur gel d'agarose 1%, tampon phosphate 0.001M, NaCl 4%, pH 7. EB: extrait brut; A: albumines; G: globulines; G-L: globulines débarrassées de leurs lectines; L: lectines globuliniques; T: thyroglobuline; X: tampon phosphate salin.

- l'essai d'inhibition de l'activité agglutinante des lectines globuliniques par les globulines est négatif: une solution de globulines à 10 mg/ml n'a aucun effet inhibiteur. PUSZTAI & WATT (1974) signalent aussi que les glycoprotéines I et II, isolées des protéines de *Phaseolus vulgaris* n'ont aucun effet inhibiteur sur les lectines de cette espèce;
- la technique de double diffusion sur gel (fig. 7) indique qu'il ne se forme aucun arc de précipitation entre les lectines globuliniques purifiées et les globulines, albumines et extrait brut. En revanche, il s'en forme un entre la thyroglobuline et les lectines purifiées ou tout autre extrait contenant des lectines.

Ainsi, il semble que les interactions lectines-globulines ne passent pas par le site de liaison de la lectine, mais qu'il s'agit d'interactions non spécifiques. Pour en avoir le cœur net, des lectines globuliniques (150 mg) ont été fixées sur du Sépharose 4B, par la même technique que pour la thyroglobuline. Ce Sépharose-lectine, mis en colonne doit être capable de fixer toute molécule globulinique susceptible d'être captée par les lectines. La figure 8a montre la capture d'une fraction des globulines débarrassées de leurs lectines, sur cette colonne. Le minuscule pic d'élu-tion obtenu à pH 3 (environ 3 mg) contient uniquement des lectines, constituées en majeure partie par le tétramère BBBB.

Ce résultat surprenant montre que les globulines débarrassées de leurs lectines par quatre passages successifs sur Sépharose-thyroglobulines (fig. 4) contenait encore des lectines (non détectables par agglutination). D'ailleurs la richesse de ces dernières en tétramères BBBB (peu érythroagglutinants) est caractéristique des dernières captures sur Sépharose-thyroglobuline (fig. 4). De plus, il semble que des lectines fixées sur Sépharose sont capables de capter des lectines, comme le fait la thyroglobuline. La figure 8b, c, montre la capture des lectines, albuminiques et globuliniques sur Sépharose 4B-lectines globuliniques. Le profil d'élu-tion est le même qu'avec Sépharose-thyroglobuline. Les diagrammes des lectines obtenues sont exactement les mêmes.

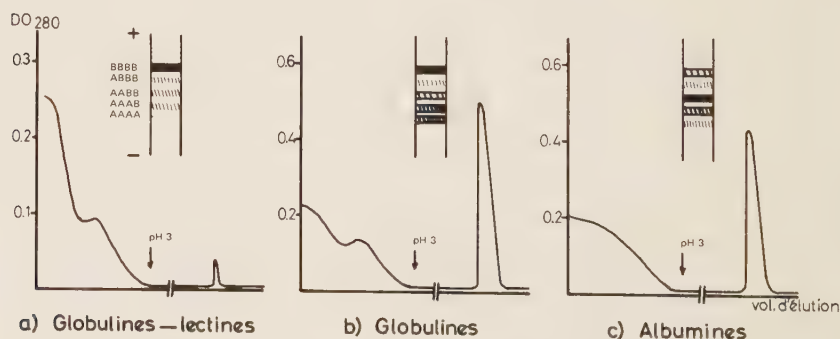


Fig. 8. — a) Essai de capture d'une substance de G—L sur Sépharose-lectines globuliniques. Le pic obtenu est analysé en électrophorèse pH 4.5.
b-c) Capture des lectines à partir de 200 mg de globulines (b) et de 200 mg d'albumines (c) sur Sépharose-lectines globuliniques. Les pics obtenus par élu-tion à pH 3 sont analysés en électrophorèse à pH 4.5.

Les lectines sont des glycoprotéines. Il n'est donc pas étonnant que la surface de leur molécule comporte des récepteurs lectiniques, ce qui pourrait expliquer les interactions lectines-lectines. Mais comment expliquer que les agrégats formés restent en solution. On peut penser que par le jeu des associations-dissociations, ils ne peuvent devenir très gros, ou bien qu'il ne se forme pas un réseau d'agrégation à trois dimensions (plus de deux sites d'interaction par molécule), mais une chaîne, un filament (deux sites d'interaction par molécule) qui peut rester en solution (HÖGLUNG & DAHLGREN, 1970).

Ce résultat intéressant (interaction lectines-lectines) ne peut cependant expliquer les interactions qui semblent exister entre les lectines et les globulines. D'ailleurs, à ce sujet on peut encore faire deux observations (fig. 9).



Fig. 9. — Electrophorèse en présence de SDS des globulines (G), de leurs lectines purifiées (L), des globulines débarrassées de leurs lectines (G-L), des albumines (A) et de leurs lectines purifiées (L).

- Le diagramme électrophorétique en présence de SDS des globulines débarrassées de leurs lectines montre que comme prévu, malgré 4 passages successifs sur Sépharose-thyroglobuline, il reste une certaine proportion de sous-unité B, non décelable sous forme tétramérique BBBB, dans le diagramme électrophorétique à pH 4.5 (fig. 6). Cette sous-unité B n'est-elle pas intégrée dans une structure moléculaire complexe, que le simple passage sur thyroglobuline n'a pu désintégrer, ce qu'a pu faire le SDS?
- Le diagramme électrophorétique en présence de SDS des albumines totales, montre une très forte proportion des deux sous-unités lectiniques (plus de 50% des albumines). Pourtant, par capture sur Sépharose-thyroglobuline, seulement 10% ont été obtenues. On peut penser qu'une très forte proportion des lectines albuminiques fait partie d'une structure moléculaire complexe, que le SDS détruit, mais que le passage sur Sépharose-thyroglobuline ne peut désintégrer.

Interaction avec des substances non salino-solubles

Les lectines que BOWLES & KAUSS (1975, 1976) isolent des membranes cellulaires de l'hypocotyle sont solubilisées en majeure partie avec le triton X100. De la même manière, KAUSS & GLASER (1974) utilisent des détergents pour solubiliser leurs lectines des parois cellulaires de l'hypocotyle. COUTREZ-GEERING & PEIFFER (1975) montrent que l'utilisation ou non de l'ultraturax (20 000 t/min) a une influence importante sur l'activité agglutinante de l'extrait de pomme de terre. Ces techniques d'extractions susceptibles de solubiliser une quantité plus importante de matériel (membranes, parois), ont été testées sur les cotylédons de la graine, de même qu'une extraction à pH 3, susceptible de briser les liaisons lectines-subsstrats. En fait, aucun de ces procédés d'extraction ne solubilise plus de lectines que l'extraction saline.

Etude des lectines pendant la maturation et la germination

L'étude du développement de la graine (maturation et germination) peut nous éclairer sur la fonction des lectines.

Les études qui ont été faites sur quelques graines de légumineuse montrent que l'activité agglutinante apparaît dans la graine en maturation, au moment de la synthèse des protéines de réserve (ROUGE, 1976; GRACIS & ROUGE, 1977). Ainsi le lieu de synthèse des lectines semble être la graine en maturation. Cependant, MIALONIER & al. (1973) signalent dans les feuilles de *Phaseolus vulgaris*, une protéine immunologiquement identique aux lectines, mais sans activité agglutinante. HOWARD & al. (1972) ne mettent en évidence les lectines que pendant la maturation et la germination de la graine de lentilles. Ils ne purent en détecter à aucun autre moment du cycle de la plante. MARTIN & al. (1964) obtiennent les mêmes résultats sur *Phaseolus lunatus*.

A la germination, l'activité agglutinante disparaît en même temps que les protéines de réserve (ROUGE, 1975; GRACIS & ROUGE, 1977) pour réapparaître dans la plante que dans les nouvelles graines en maturation (HOWARD & al. 1972).

Les graines sont prélevées sur une culture en plein champ. L'âge des graines (exprimé en jour après l'anthèse) est corrélé avec leur longueur:

Stade	Age (jours)	Longueur (mm)
1	5-10	3-5
2	10-14	5-7
3	14-18	7-9
4	18-21	9-12
5	21-24	12-16
6	24-30	16-20
7	30-37	20-25
8	>40	16-20

Le poids frais et le poids sec des graines est évalué. Les axes et les cotylédons ne sont séparés que pour les stades 5 à 8.

Pour la germination, les graines désinfectées sont mises à germer sur du papier filtre imbibé d'eau distillée. Les temps de germination retenus sont 1, 3, 5, et 12 jours.

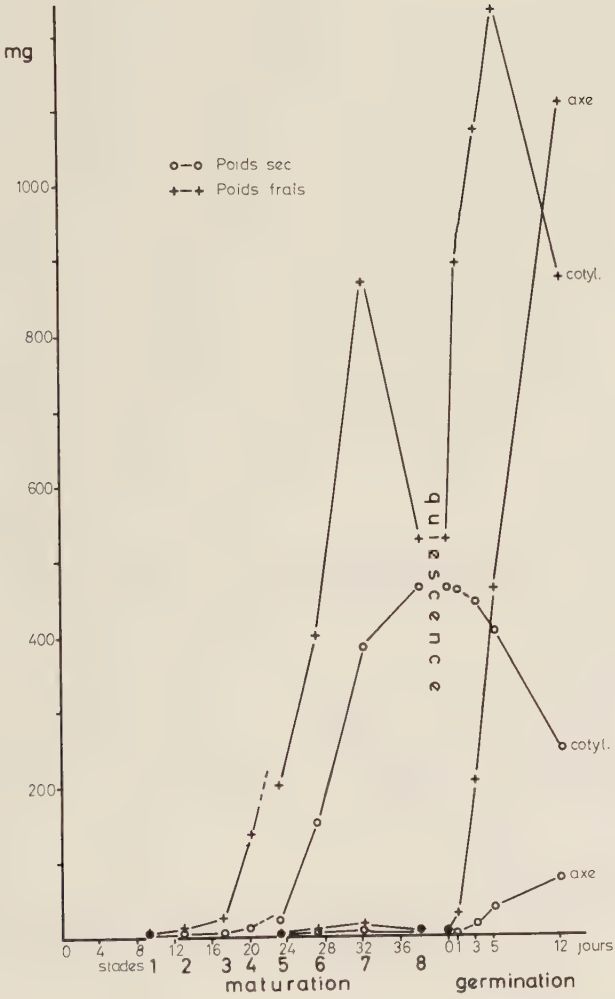


Fig. 10. — Evolution du poids sec et du poids frais au cours du développement. Stade 1-4, poids de la graine entière. Ensuite poids de ses deux cotylédons et de son axe.

<i>Jours de germination</i>	<i>Longueur de l'axe</i>
1	0.8-1.2 cm
3	2.0-3.5 cm
5	4.0-7.0 cm
12	8.0-15 cm

La figure 10 représente l'évolution du poids sec et du poids frais des axes et cotylédons au cours du développement de la graine. La période comprise entre le stade 1 et le stade 4 correspond à la phase de multiplication cellulaire de l'embryon. Au stade 5, avec la croissance très rapide du poids sec de la graine, commence la phase d'élongation cellulaire. Il s'agit du début de la synthèse des protéines de réserve et de la formation de leur organites de stockage, les corps protéiques. Dans chaque cellule cotylédonaire, ces deux phases (synthèse des protéines et formation des membranes des corps protéiques) semblent être séparée dans le temps (PRÉVOSTI, 1978). Le stade 8 correspond à la phase de dessiccation de la graine.

La germination se caractérise simplement par la croissance du poids sec de l'axe au détriment de celui des cotylédons.

Les lectines des extraits bruts, albumines et globulines des cotylédons à chaque stade de développement sont purifiées sur Sépharose-thyroglobuline. La figure 11 représente le diagramme électrophorétique à pH 4.5 des lectines. Elles n'apparaissent qu'au stade 5, au même moment que les protéines de réserve déposées

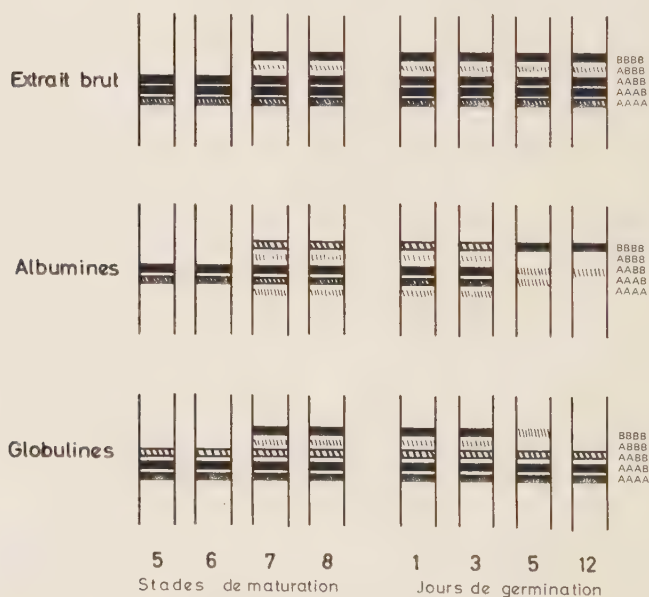


Fig. 11. — Evolution pendant le développement des électrophorégrammes à pH 4.5, des lectines purifiées des extraits bruts, des albumines et des globulines des cotylédons.

dans les cellules cotylédonaire. Ce sont les tétramères agglutinants AAAA, AAAB et AABB qui apparaissent d'abord. Dans les albumines c'est surtout l'hétérotétramère, dans les globulines surtout l'homotétramère. Le tétramère BBBB n'apparaît qu'en fin de maturation, il est principalement globulinique.

Au cours de la germination, il ne semble pas y avoir de très grands changements dans le diagramme des lectines de l'extrait brut. En revanche, les tétramères AAAB et AABB des albumines disparaissent. De plus, le tétramère BBBB, globulinique, qui n'apparaît qu'en fin de maturation passe des globulines dans les albumines.

Que peut nous apprendre l'étude des lectines de la graine en développement? Le principal problème est celui de savoir pourquoi tel ou tel tétramère acquiert son caractère albuminique ou globulinique. Au début de la maturation, seuls les tétramères AAAA, AAAB et AABB apparaissent. L'homotétramère AAAA est globulinique, l'hétérotétramère AABB est principalement albuminique, tandis que le tétramère intermédiaire AAAB est commun aux albumines et aux globulines. En fin de germination, le tétramère BBBB passe des globulines aux albumines.

On peut penser que les différents comportements de chacun des tétramères provient de leur hétérogénéité de composition. Cette hétérogénéité leur confère des propriétés différentes, peut-être des fonctions différentes. Pour en savoir plus, il est nécessaire de purifier chaque tétramère, de les étudier séparément, d'étudier les interactions de chacun d'eux avec tous les autres, et avec les globulines et les albumines (travail en cours).

Une autre question est de savoir quelle nouvelle fonction nécessite la formation des tétramères BBBB en fin de maturation. S'agit-il de la formation des corps protéiques et de leur membrane? Ceci confirme la nécessité de relier cet événement avec ceux observés *in vivo* dans la graine en maturation: microscopie électronique (PRÉVOSTI, 1978), caractérisation chimique et structurale des corps protéiques.

Au cours des expériences de germination, nous avons remarqué que le liquide de germination contenait une activité agglutinante. A 48 h de germination, 300 graines ont libéré environ 70 mg de matériel non dialysable dont le titre d'agglutination est de 16/mg. Alors que ces expériences étaient faites, un article de FOUNTAIN & al. (1977), montrant la libération de lectines par les graines de soja est paru. Les auteurs montrent que ces lectines ont la même spécificité que celles de l'embryon et concluent que ce sont vraisemblablement les mêmes, et que leur localisation est extracellulaire. Cependant chez *Phaseolus vulgaris*, elles n'ont pas du tout les mêmes propriétés. Elles ne peuvent être purifiées sur Sépharose-thyroglobuline, elles ne précipitent pas avec la thyroglobuline, mais précipitent avec l'extrait brut, les globulines et les albumines de l'embryon. Ce ne sont pas les lectines de l'embryon qui réagissent, car purifiées elles ne donnent aucun arc de précipitation avec le liquide de germination (fig. 12). Une lectine identique existe dans les téguments de la graine.

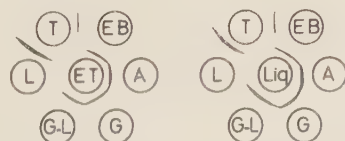


Fig. 12. — Comme figure 7; plus: ET: extrait brut de tégument; Liq: liquide de germination.

Discussion

Les lectines des embryons de *Phaseolus vulgaris* sont constituées des 5 tétramères qu'il est possible de former à partir de deux sous-unités A et B dont les propriétés sont les suivantes:

- A a un point isoélectrique supérieur à celui de B;
- A a un poids moléculaire supérieur à celui de B;
- A est à l'origine de l'activité érythroagglutinante;
- A a plus d'affinité pour la thyroglobuline que B.

L'activité et les propriétés physico-chimiques des tétramères dépendent de leur composition en sous-unité A et B.

La proportion de sous-unité A et B est à peu près équivalente ([A] légèrement supérieur à [B]) que ce soit dans albumines ou globulines. Ceci devrait aboutir dans ces deux familles protéiques à des tétramères de même composition. En fait, la polymérisation en tétramère a surtout donné des hétérotétramères dans les albumines (polymérisation au hasard entre A et B) et des homotétramères dans les globulines (polymérisation non au hasard). On peut penser que sitôt leur synthèse, une forte proportion de A d'une part, et de B d'autre part, sont ségrégués dans des compartiments cellulaires différents. Ainsi, leur polymérisation peut aboutir aux homotétramères observés dans les globulines. Le reste des sous-unités A et B, non ségrégués dans des compartiments cellulaires, polymérisent en hétérotétramères et sont albuminiques.

Les seuls travaux du même genre (pour l'instant les seuls) qui ont été faits pour étudier la répartition des lectines dans les albumines et les globulines de *Phaseolus vulgaris* sont ceux de PUSZTAI & WATT (1974). Mais les techniques utilisées sont différentes (méthode d'obtention des albumines et globulines, analyses électrophorétiques) et les résultats peu comparables: la majorité des lectines sont albuminiques. Elles sont constituées par un groupe de nombreuses "isoelectines" variant par leur point isoélectrique. Le diagramme obtenu en électrofocalisation est aussi complexe que celui que nous obtenons en électrophorèse à pH 8.3. Ces isoelectines sont constituées de deux sous-unités de PM 30 000 et 35 000 (correspondant à celles que nous appelons respectivement B et A) et sont présentes dans les albumines suivant le rapport 3/1. En revanche, dans les globulines, il n'existe que la sous-unité de PM 30 000, bien que le diagramme en électrofocalisation reste aussi complexe. En outre, les activités érythroagglutinantes et leucoagglutinantes semblent portées par la même sous-unité de PM 30 000 (B). Ces résultats contradictoires demandent à être expliqués, d'autant plus que ce n'est pas dans la différence de variété utilisée que résident ces contradictions, car un échange de graines ayant eu lieu entre nos deux laboratoires, les résultats restent inchangés.

Les lectines représentent environ 12% des protéines de l'embryon. Leur apparition pendant la maturation coïncide avec celle des protéines de réserve de la graine (ROUGE, 1975, 1976). Ceci suggère fortement qu'elles en font partie.

Les réserves protéiques de la graine se caractérisent par une dessiccation très poussée (rarement observée pour des protéines) et une structuration ordonnée et

compacte en un volume minimum, compatible avec les possibilités de dissémination de la graine. Les organites de stockage de ces réserves sont les corps protéiques. Les processus de regroupement et d'agrégation des molécules lectiniques vers ou dans les corps protéiques pourraient être favorisés par les interactions lectines-lectines. D'autre part, une graine contient environ 10% d'eau, ce qui est très faible puisque l'eau dite "liée" à une protéine, nécessaire au maintien de sa structure spatiale est de l'ordre de 20 à 50%. Ainsi, dans la graine, cette eau est sûrement cantonnée dans les protéines et non dans l'amidon. De plus, les phénomènes d'agrégation entre protéines (lectines) peuvent favoriser une telle dessiccation. En effet, les interactions de l'eau avec la surface des protéines, nécessaires à leur maintien, peuvent être remplacées peu à peu, en fin de maturation de la graine, par des interactions du même type (électrostatiques), non plus eau-protéines, mais protéines-protéines. La capacité d'interaction lectines-lectines pourrait participer à ce phénomène.

Par ailleurs, les interactions suggérées par l'observation expérimentale entre les lectines et d'autres molécules de l'extrait, permettent d'étendre de tels mécanismes à l'ensemble des protéines de la graine: regroupement des réserves protéiques en des structures ordonnées, compactes et deshydratées que constituent les corps protéiques et leur membrane. L'étude des corps protéiques purifiés, de leur organisation spatiale et de la localisation des lectines permettra d'approfondir la question (MIÈGE & MASCHERPA, 1976).

Pour conclure, il est nécessaire d'insister sur le fait que ces glycoprotéines, dont la fonction principale semble être celle de réserve protéique peuvent avoir des fonctions secondaires. Beaucoup de chercheurs (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974; WOLPERT & ALBERSHAIM, 1976; DAZZO & HUBBELL, 1975) travaillent sur l'hypothèse que les lectines des graines de légumineuses interviennent dans les interactions avec les micro-organismes et en particulier le *Rhizobium* symbiotique des légumineuses. Les interactions sont en effet très spécifiques d'une espèce ou d'une variété à l'autre. Si les lectines, protéines de réserve, ont une certaine utilité pour la plante dans ces interactions spécifiques vitales avec le *Rhizobium* (fixation de l'azote) on peut penser que cette fonction secondaire peut prendre de l'importance dans la sélection évolutive.

D'autre part, il est certain que les lectines, détectées de plus en plus fréquemment dans tout le règne vivant ont des fonctions variées. Il est évident que les interactions spécifiques entre un sucre ou une structure exposant des sucres, et des protéines sont la base de nombreux mécanismes biologiques dans la nature, et en particulier des mécanismes de reconnaissance. Les lectines des téguments, libérées dans le milieu de germination et précipitant avec l'extrait protéique de l'embryon ont sûrement une fonction différente de celles de l'embryon qu'il serait intéressant de caractériser.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLAN, D. & M. J. CRUMPTON (1971). Fractionation of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44: 1143-1148.
- ALLEN, L. W., R. H. SVENSON & S. YACHNIN (1969). Purification of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: isolation of a potent and weak phytohemagglutinins possessing mitogenic activity. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 63: 334-341.

- ANDREWS, A. T. & J. JAYNE-WILLIAMS (1974). The identification of a phytohemagglutinin in raw navy beans (*Phaseolus vulgaris*) toxic for Japanese Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Brit. J. Nutr.* 32: 181-188.
- BOLHOOL, B. B. & E. L. SCHMIDT (1974). Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Science* 185: 269-271.
- BOWLES, D. J. & H. KAUSS (1975). Carbohydrate-binding proteins from cellular membranes of plant tissue. *Pl. Sci. Lett.* 4: 411-418.
- & H. KAUSS (1976). Characterization, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from *Phaseolus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* 443: 360-374.
- CLARKE, A. E., R. B. KNOX & M. A. JERMYN (1975). Localisation of lectins in legume cotyledons. *J. Cell. Sci.* 19: 157-167.
- COUTREZ-GEERING, D. & S. PEIFFER (1975). La lectine de pomme de terre: activité érythroagglutinante en fonction de la physiologie de l'organe de réserve. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique* 108: 17-30.
- DAHLGREN, K., J. PORATH & K. LINDAHL-KIESSLING (1970). On the purification of PHA from *Phaseolus vulgaris* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 306-314.
- DAZZO, F. B. & D. H. HUBBELL (1975). Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association. *Appl. Microbiol.* 30: 1017-1033.
- DERBYSHIRE, W., D. J. WRIGHT & D. BOULTER (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24.
- ELSON, E. & T. M. JOVIN (1969). Fractionation of oligodeoxynucleotides by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 27: 193-204.
- FELSTED, R. L., R. D. LEAVITT & N. R. BACHUR (1975). Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 405: 72-81.
- FOUNTAIN, D. W., D. E. FOARD, W. D. REPLOGUE & W. K. YANG (1977). Lectin release by soybean seeds. *Science* 197: 1185-1187.
- FOX, T. O., J. R. SHEPPARD & M. M. BURGER (1971). Cyclic membrane changes in animal cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 68: 244-247.
- GRACIS, J. P. & P. ROUGE (1977). Evolution des hémagglutinines de *Vicia sativa* L. au cours du cycle du développement de la plante. *Bull. Soc. Bot. France* 124: 301-306.
- HÖGLUNG, S. & K. DAHLGREN (1970). On the morphology of phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* seeds. *Eur. J. Biochem.* 17: 23-26.
- HOWARD, I. K., H. SAGE & C. B. HORTON (1972). Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. *Biochem. Biophys. Acta* 149: 323-326.
- KAUSS, H. & C. GLASER (1974). Carbohydrate-binding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extension growth. *FEBS Lett.* 45: 304-307.
- KORNFELD, R. & S. KORNFELD (1970). The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 245: 2536-2545.
- LEAMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- LEAVITT, R., R. FELSTED & N. BACHUR (1975). Isolation of five isolectins of phytohemagglutinin from red kidney beans. *Fed. Proc.* 34: 2020.
- LESENEY, A. M., R. BOURILLON & S. KORNFELD (1972). The nature of the erythrocyte receptor site for Robinia pseudoacacia phytohemagglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 831-836.
- LIS, H. & N. SHARON (1973). The biochemistry of plant lectins (PHAs). *Annual Rev. Biochem.* 42: 541-574.

- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MANEN, J.-F. (1978). Comparaison entre les lectines des graines de quelques Phaseolus. *Candollea* 33: 193-200.
- & M.-N. MIÈGE (1977). Purification et caractérisation des lectines isolées dans les albumines et les globulines de Phaseolus vulgaris. *Physiol. Veg.* 15: 163-173.
- MARTIN, F. W., E. WASZCZENKO-ZACHARCZENKO, W. C. BOYD & K. F. SCHERTZ (1964). Lectin content of the lima bean during development of the seed and seedling. *Ann. Bot. (London)* 28: 319-324.
- MAURER, H. R. (1971). *Disc electrophoresis and related technique of polyacrylamide gel electrophoresis*. De Gruyter, Berlin, New York. 44 pp.
- MIALONIER, G., J. P. PRIVAT, M. MONSIGNY, G. KAHLEM & R. DURAND (1973). Isolement, propriétés physicochimiques et localisation in vivo d'une phytohémagglutinine (lectine) de Phaseolus vulgaris L. (var. rouge). *Physiol. Veg.* 11: 519-537.
- MIÈGE, M.-N. & J.-M. MASCHERPA (1976). Isolation and analyse of protein bodies from cotyledons of Lablab purpureus and Phaseolus vulgaris (Leguminosae). *Physiol. Pl.* 37: 229-238.
- MILLER, J., C. NOYES, R. HEINRIKSON, H. S. KINDON & S. YACHNIN (1973). Phytohemagglutinin mitogenic proteins. Structural evidence for a family of isomitogenic proteins. *J. Exp. Med.* 138: 939-951.
- & R. HSU (1975). Extensive homology between the subunits of PHA mitogenic proteins derived from Phaseolus vulgaris. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 72: 1388-1391.
- OH, Y. H. & R. A. CONARD (1972). Further studies on mitogenic components of Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin: subunit structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 631-637.
- PRÉVOSTI, A.-M. (1978). Thèse, Univ. Genève (en préparation).
- PUSZTAI, A. & W. B. WATT (1970). Glycoprotein II. The isolation and characterization of a major antigenic and non-hemagglutinating glycoprotein from Phaseolus vulgaris. *Biochim. Biophys. Acta.* 207: 413-431.
- & W. B. WATT (1974). Isolectins of Phaseolus vulgaris. A comprehensive study of fractionation. *Biochim. Biophys. Acta* 365: 57-71.
- R. D. D. CROY, G. GRANT & W. B. WATT (1977). Compartmentalization in the cotyledonary cells of Phaseolus vulgaris L. seeds: a differential sedimentation study. *New Phytol.* 79: 61-71.
- REISFELD, R. A., U. J. LEWIS & D. E. WILLIAMS (1962). Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195: 281-283.
- ROUGE, P. (1975). Devenir des phytohémagglutinines provenant des diverses parties de la graine dans les jeunes germinations du pois. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 280: 2105-2108.
- (1976). Biosynthèse des hémagglutinines au cours de la maturation des graines de pois. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 282: 621-623.
- SALK, J. E. (1944). A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *J. Immunol.* 49: 87-98.
- SELA, B. A., H. LIS, N. SHARON & L. SACHS (1973). Isolectins from wax bean with differential agglutination of normal and transformed mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 310: 273-277.
- TAKAHASHI, T., T. YAGI, I. E. LIENER & T. ODA (1974). Dissociation of wax bean hemagglutinin by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.* 38: 865-867.
- TOYOSHIMA, S., M. FUKUDA & T. OSAWA (1972). Chemical nature of the receptor site for various phytomitogens. *Biochem.* 11: 4000-4005.

- TULLY, R. E. & H. BEEVERS (1976). Protein bodies of castor bean endosperm. Isolation, fractionation and characterization of protein components. *Pl. Physiol.* 58: 710-716.
- WEBER, T. H., H. ARO & C. T. NORDMAN (1972). Characterization of lymphocyte-stimulating blood cell-agglutinating glycoproteins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim. Biophys. Acta* 263: 95-105.
- WOLPERT, J. S. & P. ALBERSHEIM (1976). Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont *Rhizobia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70: 729-737.
- YACHNIN, S. & R. H. SVENSON (1972). The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology* 22: 871-883.

